

Bt 几丁质酶的基础表达及诱导合成的多态现象

谢池楚¹, 陈月华^{1,2}, 蔡峻^{1,2}, 刘传¹, 陈艳玲¹

1 南开大学微生物学系, 天津 300071

2 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要: 多数微生物可以产生几丁质酶。一般认为几丁质酶基因表达受几丁质的诱导和葡萄糖抑制。但是苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 Bt) 几丁质酶的诱导表达方式是否与其他微生物相同, 至今尚无定论。采用 DNS 法检测 77 株 Bt 在有或无诱导物培养基中的几丁质酶活力。研究了葡萄糖对 4 株不同表达类型菌株酶活力的影响, 以及葡萄糖抑制与几丁质诱导之间的关系。研究发现在无几丁质诱导条件下, 全部试验菌株都可以产生几丁质酶, 保持一定量的基础表达, 说明 Bt 能组成型合成几丁质酶, 不需要诱导。添加诱导物之后, 31 株菌的酶活力没有任何变化, 44 株菌有不同程度的提高, 但其中绝大部分诱导特性并不典型, 酶活力提高不显著。许多 Bt 菌株几丁质酶表达兼具组成型和诱导型的特点。葡萄糖能够抑制几丁质的诱导作用, 但是不能完全抑制 Bt 菌株几丁质酶的基础表达。比较组成型和诱导型菌株的几丁质酶基因 *chiA*、*chiB* 调节区域核苷酸序列, 发现仅存在个别碱基的差异。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 几丁质酶, 基础表达, 诱导多态性

Essential expression and inducible synthesis polymorphism of chitinase in *Bacillus thuringiensis*

Chichu Xie¹, Yuehua Chen^{1,2}, Jun Cai^{1,2}, Chuan Liu¹, and Yanling Chen¹

1 Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin 300071, China

Abstract: Chitinases were produced by a lot of microorganisms. Chitinase gene expression in most of the chitinase producing bacteria was inducible by chitin. Low levels of chitinase were observed in the presence of glucose. To date, however, the regulation of such chitinase gene in *Bacillus thuringiensis* had not been well studied. In this paper, all 77 *Bacillus thuringiensis* strains were grown in the medium with or without chitin. We measured quantitatively the chitinase activity of the cultures. Moreover, we investigated the suppressive effect of glucose on chitinase of 4 strains. Also we studied the relationship between chitin induction and glucose suppression on chitinase. This investigation demonstrated that all tested *B. thuringiensis* strains could produce chitinase without chitin. After induction, the chitinolytic activity of 31 tested strains had no obvious response to the inducer, whereas 44 stains increased in different degree. Among these strains, most of them did not markedly increase the levels of chitinase, and many stains simultaneously displayed the expression mode of inducible and constitutive. The glucose inhibited the inductive effect of chitin, but it could not inhibit the basal expression of chitinase. Two strains No. 38 and No. 75 belonged to different expression types. But we just found several different bases in the regulatory region of chitinase genes *chiA* and *chiB* from them.

Received: April 27, 2010; Accepted: July 12, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30971957).

Corresponding author: Yuehua Chen. Tel: +86-22-23505964; Fax: +86-22-23508800; E-mail: yhchen@nankai.edu.cn

国家自然科学基金项目 (No. 30971957) 资助。

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, chitinase, essential expression, inducible synthesis polymorphism

几丁质酶 (Chitinase, EC3.2.1.14) 是一种专一性降解几丁质的水解酶类, 可将几丁质降解为几丁单糖或寡糖^[1]。基于几丁质酶在农业、工业、临床医学和制药等方面的重要作用, 近年来引起人们广泛的关注^[2]。苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 Bt) 是商业化的杀虫细菌, 在我国已开发应用几十年。Bt 除了能够形成杀虫晶体外, 也普遍产生几丁质酶^[3-4]。不少学者已经克隆并表达 Bt 几丁质酶基因, 证明该酶不但可以抑制真菌的生长还能够明显增效 Bt 的杀虫活性^[4-7]。然而, 一般认为 Bt 几丁质酶也是诱导酶, 在不加诱导物时, 酶活力很低或几乎没有。因此 Thamthiankul 等和 Hu 等把几丁质酶结构基因同其它基因的启动子融合, 成功地使几丁质酶不需诱导而组成型表达, 使 Bt 的杀虫活性显著提高^[8-9]。

几丁质酶普遍存在于各种微生物中。一般认为微生物几丁质酶基因受抑制物/诱导物系统的调控, 葡萄糖明显抑制几丁质酶的合成^[10]。目前报道的各类产生几丁质酶的微生物菌株都是在几丁质平板上筛选出来的, 这些菌株在无诱导物存在时是否能够产生几丁质酶, 至今国内外未见报道。因此, 不少学者在研究各类微生物的几丁质酶时, 为了获得更高的酶活力都会自然地在培养基中加入几丁质或其衍生物作为诱导物^[11-13]。

最近 Arora、Barboza 以及本实验室分别发现某些 Bt 菌株能在没有诱导物的培养基中产生几丁质酶, 并且加入葡萄糖对酶的表达影响不大^[14-16]。这些组成型表达几丁质酶的 Bt 菌株仅是个别现象还是普遍存在? 目前尚无定论。关于 Bt 菌株自身几丁质酶表达的调控研究, 几乎未见任何报道。而了解 Bt 几丁质酶的表达特点才可以有效地利用及改造这一功能基因, 也能为提高 Bt 应用范围和增强其生防效率提供依据。同时为微生物碳源利用与基因调节方面的重大理论问题提供相关研究基础。

本研究利用遗传学方法将含有几丁质酶基因的 77 株 Bt 菌株^[4]培养在有/无诱导物的培养基中, 比较各个菌株对诱导物的应答特点及其酶活力。经统计分析后我们发现, 多数苏云金芽胞杆菌能够组成

型表达几丁质酶, 又兼具诱导特性, 表现出酶合成的多态现象。本文首次就以上研究结果进行报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、培养基

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 共 77 株, 全部含有几丁质酶编码基因, 由本实验室保藏。其中 17 株保藏于南开大学微生物资源保藏中心 (NKCCMR), 2 株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)。对照菌株地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* MY75, 本室鉴定并保藏^[17]。质粒转化宿主为大肠杆菌 *Escherichia coli* XL-Blue。培养基: LB 培养基用于活化 Bt 菌; 基础培养基 (M): 每 100 mL 水中含 KH_2PO_4 0.1 g, Na_3PO_4 0.2 g, MgSO_4 0.05 g, KCl 0.05 g, 酵母粉 1 g, pH 7.2~7.4; 几丁质诱导培养基 (C): 在 M 中加入 1% 几丁质粉; 葡萄糖培养基 (G): 在 M 中加入 2.5% 葡萄糖; 几丁质、葡萄糖培养基 (GC): 在 M 中加入等量的葡萄糖和几丁质粉。胶体几丁质的制备参照文献^[18]进行。

1.1.2 主要试剂和仪器

几丁质购买自浙江省玉环县海洋生物化学有限公司。PCR 扩增试剂和克隆用 pMDTM18-T 载体, 购自大连宝生物公司; DNA 回收纯化试剂盒、及质粒分离纯化试剂盒等购自上海 Sangon 公司。主要仪器有: BioRad Smartspect 3000 紫外分光光度计和 MJ Research PCR 仪。

1.2 几丁质酶活力的测定

77 株菌在 LB 培养基中活化 12 h 后按 1% 量分别转接培养基 M 和 C, 30℃ 振荡培养 72 h 检测酶活力。酶活力的测定采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, 简称 DNS) 比色法^[19]。一个酶活力单位定义为: 50℃、pH 6.0 条件下反应 1 min 产生 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 的酶量。酶活力测定结果均为 3 次以上试验的平均值。通过生物统计软件 SPSS 16.0 中的 *t* 检测法分析实验结果。

1.3 葡萄糖对几丁质酶活力影响的测定

将实验的 Bt 菌株在 LB 培养基中活化培养 12 h 后,按 1% 量转接培养基 G、C 和 GC。30℃ 摇床振荡培养 3 d 后,含葡萄糖培养物的上清液使用 MILLIPORE 离心超滤管浓缩后,磷酸缓冲液 (pH 6.0) 洗 1 次,除去残余葡萄糖,加入磷酸缓冲液至原体积,再进行酶活力测定,并使用 DNS 法测定上清液中剩余含糖量。

1.4 几丁质酶基因 *chiA*、*chiB* 的克隆

常规方法提取菌株的基因组 DNA 作为 PCR 模板。*chiA* 和 *chiB* 基因扩增均采用 touchdown PCR 程序。扩增 *chiA* 所用引物:*chiAF*: 5'-ATCATTGTAATG TGGCGTAT-3', *chiAR*: 5'-TAAATCGTGGTATTGGG AC-3'; PCR 扩增条件: 94℃ 4 min; 94℃ 50 s, 51℃~48℃ 复性 50 s, 每个循环降低 1℃, 72℃ 1.5 min, 小循环 4 次共计 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增 *chiB* 所用引物及条件参照文献[16]。将电泳检测正确的扩增片段回收纯化后连接 pMDTM18-T 克隆载体,转化 *E. coli* XL-Blue 感受态细胞。提取转化子的重组质粒,鉴定后送公司测序。核苷酸序列分析使用 BLAST、BDGP 和 SoftBerry-Bprom 在线分析软件。

2 结果与分析

2.1 77 株苏云金芽胞杆菌在有/无诱导物培养时几丁质酶活力调查

在基础培养基 (M) 和几丁质诱导培养基 (C) 中分别培养 77 株苏云金芽胞杆菌,检测每一菌株在 2 种培养基中的酶活力。经过对数据的归纳分析后,按诱导效率由大至小排序,选取有代表性的 32 株菌原始数据列于表 1 中。有关 77 株苏云金芽胞杆菌酶活力分布统计和诱导效率将在 2.2 和 2.3 中分析。

从表 1 中基础培养基 (M) 一栏的数据可见,在不诱导时 32 株菌都可以检测到酶活力。表 1 中的前 20 个菌株经诱导后的酶活力明显比不诱导时高,其中多数菌株在 2 种培养基中的酶活力差异极其显著 ($P < 0.01$),诱导后的酶活力提高了 30% 以上,从这一特点考虑应称这些菌株为诱导型。然而其中有些菌株如 19、21、88 号等 6 株菌 (阴影标记) 虽然诱导效果极其显著,但是不诱导时它们的酶活力也比较高,可达到 3 U/mL 以上,兼具组成型特性。因此,

这些菌株很难定义是组成型还是诱导型。

表 1 中后 12 个菌株在有/无诱导物的 2 种培养条件下的酶活力无太大的变化,统计分析结果大多无显著性差异。这些菌株对几丁质的诱导不表现应答能力,故称为组成型菌株。少数菌株经诱导后的酶活力反而更低,表现出负诱导效应。同属组成型菌株,最低的 23 号菌株其酶活力不到 0.5 U/mL,而 54、27、36 号等 4 株菌 (下划线标记) 高达 5 U/mL 左右,是前一菌株的 10 倍,说明 Bt 菌株中基础表达的几丁质酶活力相差很大。

2.2 诱导前后 77 株菌几丁质酶活力的分布统计

图 1 是依据 77 株菌的酶活力结果,统计出诱导前后不同酶活力菌株数的分布。将酶活力低于 1.5 U/mL 的菌株称为低酶活力菌株,酶活力在 1.5~4.5 U/mL 的为中等酶活力菌株,高于 4.5 U/mL 属于高酶活力菌株。从图中可以看出,无论诱导还是不诱导,低酶活力和中等酶活力 Bt 菌株都占绝大多数,高酶活力菌株很少。32 株菌属于低酶活力,约占 42%。而中等酶活力以上的占 58% 共 45 株,其中高酶活力的仅有 5 株。这一结果说明在无诱导条件下,实验的菌株都能产生几丁质酶 (具体数据见表 1 第 2 栏),证明 Bt 能组成型基础合成几丁质酶,不需要诱导,只是酶活力普遍不高。而在加入诱导物之后,低酶活力的菌株减少一半,中等酶活力菌数则有一定幅度的提高,由 40 株上升至 50 株,占全部菌株的 65%;高酶活力菌株略有增加。结果说明,虽然 Bt 合成几丁质酶的能力不需要诱导,但仍有 56% 菌株对几丁质诱导有反应,表现出经诱导后酶活力提高的代谢规律。

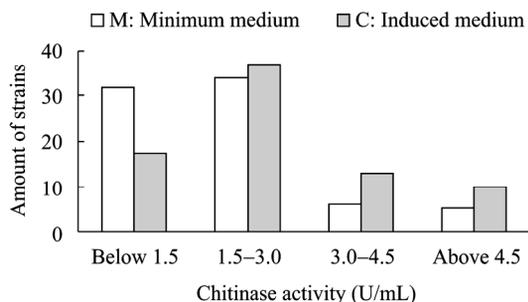


图 1 在有/无诱导培养条件下 77 株菌酶活力分布的统计
Fig. 1 Statistics of chitinase activity of 77 strains cultured with or without inducer.

表 1 32 株苏云金芽胞杆菌在有/无诱导条件下的几丁质酶活力
Table 1 The chitinase activity of 32 *B. thuringiensis* strains (U/mL)

No. (Strain original number)	Minimum medium (M) ($\bar{x} \pm s$)	Induced medium (C) ($\bar{x} \pm s$)	Induced times
0 (MY75) ^c	2.95±0.129	45.62±0.758 ^a	14.5
75 (1512C0002010000263) ^d	0.37±0.040	3.91±0.188 ^a	9.7
17 (1512C0002010000210)	0.77±0.186	2.99±0.089 ^a	2.9
33 (CGMCC No. 2327) ^e	1.03±0.135	4.04±0.090 ^a	2.9
49 (95492)	0.82±0.180	3.07±0.157 ^a	2.7
13 (1512C0002010001401)	0.82±0.413	2.74±0.128 ^b	2.4
3 (1512C0002010000346)	0.99±0.106	2.90±0.074 ^a	1.9
14 (1512C0002010000340)	2.39±0.490	6.44±0.422 ^a	1.7
5 (968103-3)	1.44±0.175	3.82±0.173 ^a	1.6
79 (1512C0002010000305)	0.58±0.071	1.47±0.047 ^a	1.5
83 (97367-12-3)	1.63±0.121	3.54±0.183 ^a	1.2
19 (9515C13-1)	3.45±0.093	7.39±0.133 ^a	1.1
21 (86410)	3.80±0.369	7.49±0.163 ^a	1.0
7 (1512C0002010000363)	1.02±0.166	1.90±0.111 ^a	0.9
8 (97345-16)	0.70±0.134	1.36±0.173 ^b	0.9
88 (9815C13-2)	3.12±0.016	4.96±0.125 ^a	0.6
2 (H12)	5.41±0.099	8.13±0.409 ^a	0.5
18 (97367-12-2)	3.04±0.028	4.41±0.071 ^a	0.5
81 (1512C0002010000317)	1.90±0.112	2.85±0.055 ^a	0.5
29 (96425-9)	2.65±0.067	3.55±0.463	0.3
89 (CGMCC No.0528)	4.24±0.075	5.36±0.103 ^a	0.3
38 (96403-4)	2.48±0.212	2.70±0.198	0.1
54 (Jun-50)	4.97±0.064	5.33±0.280	0.1
82 (1512C0002010000365)	1.14±0.028	1.25±0.102	0.1
23 (95239-2)	0.47±0.080	0.43±0.119	-0.1
27 (96849-5)	6.17±0.731	5.84±0.727	-0.1
36 (96519-11)	5.18±0.236	4.84±0.183	-0.1
51 (1512C0002010000359)	4.96±0.166	4.48±0.189	-0.1
53 (1512C0002010000203)	2.58±0.122	2.40±0.235	-0.1
80 (1512C0002010000306)	3.08±0.047	2.82±0.108	-0.1
85 (1512C0002010001453)	1.53±0.155	1.19±0.075	-0.2
64 (984-3)	2.20±0.035	1.60±0.062 ^a	-0.3
34 (95113-5)	2.86±0.513	1.31±0.043 ^b	-0.5

a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: strain of inducible expression; d: NanKai Collection Center for Microorganisms Resource (NKCCMR); e: China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC).

2.3 几丁质诱导效率的统计分析

实验对照菌株地衣芽胞杆菌 MY75 是典型诱导菌株, 不诱导时酶活力仅为 3.0 U/mL 左右, 诱导后可达 45 U/mL 以上, 酶活力可以提高 14.5 倍! 而同属诱导型的 Bt 菌株, 诱导效率远远不及 MY75, 且相差很大, 绝大部分菌株诱导倍数在 0.3~2.9 之间。可见虽然都是芽胞杆菌, 它们在碳源利用的代谢调控方式上存在着明显差异。依据表 1 第 4 栏的数据, 统计出各种诱导效率菌株所占比例, 见图 2。

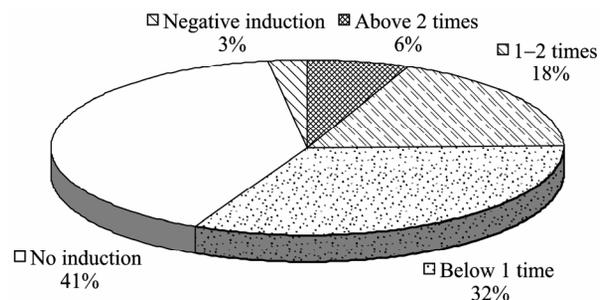


图 2 77 菌株中不同诱导效率菌株所占比例
Fig. 2 Ratios of different induction efficiency of the 77 strains.

从统计结果明显看出, 无诱导作用菌株和低诱导效率菌株占全部菌株的 73%。证明大部分 Bt 菌株即使诱导, 效果也非常不明显, 不能显著提高酶活力。诱导后的酶活力比不诱导提高 1 倍以上的约占全部菌数的 18%, 诱导效率高于 2 倍的仅占 6%, 还有 3% 菌株诱导后酶活力显著降低。

2.4 葡萄糖对 Bt 几丁质酶表达的影响

为了考察葡萄糖抑制效应对几丁质酶表达的影响, 用明显诱导型菌株 33 号、75 号和组成型菌株 38 号、54 号为材料, 将地衣芽胞杆菌 MY75 菌株作为典型诱导型的对照, 分别测定这些菌株在添加葡萄糖 (G)、添加几丁质 (C) 和 2 种都添加 (GC) 的 3 种培养基中的酶活力。为了避免葡萄糖耗尽导致几丁质酶的表达, 对培养物上清中的残糖量进行了测定, 所有菌株的剩余葡萄糖量都为初始糖浓度的 20% 左右。考虑到在含有葡萄糖培养基中的生物量高于不含糖的培养基, 为了消除误差采用酶的比活力单位, 即用几丁质酶活力除以蛋白质的量 (mg) 得出酶的比活力。详细结果如图 3 所示。

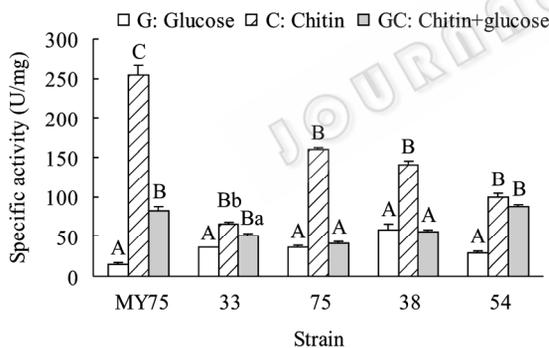


图3 苏云金芽胞杆菌 4 菌株在 3 种不同培养基中几丁质酶的比活力

Fig. 3 Specific activity of four strains in three different culture medium. Values followed by different capital letters and small letters are significantly different at 0.01 and 0.05 levels respectively according to *t*-test.

图中 G 和 GC 组数据反应出当培养基中存在葡萄糖时, 葡萄糖阻遏作用及菌株对诱导物的应答情况。对照 MY75 菌株, G 中酶比活力很低, 证明葡萄糖严格地抑制酶的合成, 而 GC 中酶比活力明显提高, 两组数据之间具有极显著差异, 诱导效率非常明显。

在培养基中加入葡萄糖后, 从图中 G 组数据可以看出, 实验的 4 株 Bt, 无论组成型还是诱导型, 酶的比活力都比对照菌株明显高, 证明苏云金芽胞杆菌在无诱导物时仍有基础表达, 与上述 77 株菌在基础培养基的检测结论一致。该结果还证明这种基础表达不能完全被葡萄糖抑制。

一般认为, 酶在组成型表达的同时也表现出抗葡萄糖的阻遏作用。实验的 4 株菌中, 38 号和 54 号是组成型, 但只有 54 号在诱导物和葡萄糖同时存在的 GC 培养基中, 对诱导物仍有应答, 表现明显抗葡萄糖阻遏, C 和 GC 组数据无显著性差异。38 号不具备这一特征。而诱导型的 33 号也表现出抗葡萄糖阻遏的特征。说明葡萄糖在调节苏云金芽胞杆菌几丁质酶表达的方式上较为复杂。这些结果也进一步说明, 依据酶的表达方式很难界定 Bt 菌株是组成型还是诱导型。

2.5 不同类型菌株几丁质酶基因调节区域序列的差异分析

对诱导型菌株 75 号和组成型菌株 38 号, 分别克隆了它们的几丁质酶基因 *chiA*、*chiB*。它们各自在 GenBank 的收录编号见图 4。2 个基因各自调节区域的全长, 分别为起始密码子上游 194 和 226 个碱基, 包括了全部的顺式作用元件, 如 SD 序列、-10、-35 区以及完整的潜在启动子。序列比对结果见图 4。

图 4 上部分显示 2 个菌株 *chiA* 基因调节区域。2 条序列同源性达 93%, 它们的调节元件如 SD 序列、-10 区和-35 区的碱基序列完全一致。仅有 6 个碱基的差异, 不同的碱基用暗色底纹标记。其中 1 个位于推测的启动子内-70 处, 组成型 38 号菌株为 G, 而诱导型 75 号菌株为 A。另外 5 个不同碱基分散于-3 至-136 处。

图 4 下部分为 2 个 *chiB* 基因, 它们调节区域的同源性达 99%, 仅有 3 个碱基不同, 其中一个位于推测的-10 区内, 38 号菌株为 G, 而 75 号菌株为 T。另外 2 个不同碱基分别在-176 和-184 处。全部位于推测的启动子内。

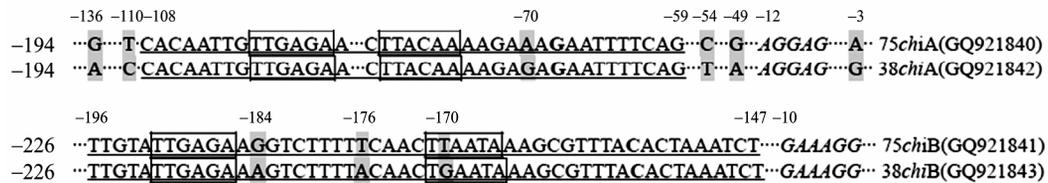


图 4 诱导型和组成型菌株 *chiA*、*chiB* 基因调节区域序列比对分析

Fig. 4 Sequence alignment of the regulatory region of *chiA* and *chiB* from the constitutive and inducible strain. The different bases are in the gray background. The dot represents the same base. The start codon was named +1. The underlined sequences are the potential promoters. The bolded base is the putative start site of transcription. The framed sequences are the -10 boxes and -35 boxes. The italicized sequences are the putative Shine-Dalgarno sequences.

75 号和 38 号菌株分别为诱导型和组成型合成几丁质酶菌株。基因调节区域的这些差异碱基有可能是酶合成调控中的关键作用位点,有待通过定点突变后的表型变化进一步证明。

3 讨论

几丁质酶广泛存在于 Bt 中,但包括 Bt 在内的许多细菌几丁质酶产生方式尚无定论。多数学者认为,细菌几丁质酶的合成受到诱导物/抑制物系统的双向调节,普遍以为经几丁质诱导后,酶的活力会大幅度提高^[10]。本文首次较大范围地调查了苏云金芽胞杆菌几丁质酶活力的分布及其诱导表达特性。研究证明绝大部分苏云金芽胞杆菌几丁质酶的合成不会因为存在诱导物而明显提高,诱导效率高的仅为个别菌株,部分 Bt 菌株表达几丁质酶兼具有组成型和诱导型特性。而几丁质对不同菌株的诱导效率也存在差异,少部分菌株在诱导物存在的情况下酶活力反而降低。说明苏云金芽胞杆菌在几丁质酶合成的方式上具有多态性。不同菌株之间酶活力差异比较大,酶活力较高的菌株比较少,即使 75 号菌株诱导效率达到 10 倍,但最终的酶活性也属中等程度。因此,如果希望利用几丁质酶加强 Bt 的杀虫活性或者扩大其生防范围,最好是引入高效表达的几丁质酶基因^[15]。

本实验选取对诱导反应明显和反应不明显的 4 株 Bt 菌,考察葡萄糖对几丁质酶合成的阻遏作用。发现 Bt 菌株并不遵循组成型抗葡萄糖、诱导型对葡萄糖敏感的规律,同样说明 Bt 菌株几丁质酶合成存在多态现象。

在枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 及相近属种中,

涉及碳源分解代谢的控制属于全局性调节,主要由调节蛋白复合物结合到靶操纵子的应答元件上而实施调控^[20]。另有文献报道,与苏云金芽胞杆菌亲缘关系极其接近的蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus chiB* 基因中,具有调节蛋白可能结合的序列^[21]。本研究中的 38 号和 75 号菌株的 *chiB* 基因调节区域中都含有这一顺式作用元件,而 *chiA* 基因没有类似序列。因此,Bt 菌株两种几丁质酶基因的调节方式有可能不一样,进一步使 Bt 菌株几丁质酶的合成呈现多态性。

有学者在研究链霉菌的几丁质酶基因表达时,将启动子内同向重复序列中一个碱基改变,导致原本受几丁质诱导、受葡萄糖阻遏的基因调控方式完全改变,转录时对葡萄糖不再敏感,能组成型表达几丁质酶^[11,22]。本研究发现,组成型与诱导型表达的 *chiB* 基因调节区域虽然仅有 3 个碱基不同,但全部位于推测的启动子内。这些发现,为进一步从分子水平深入探讨苏云金芽胞杆菌 *chi* 基因中哪些序列或碱基是关键性的调节部位奠定了研究基础。

REFERENCES

- [1] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1993, **293**: 781-788.
- [2] Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **26**(7): 473-483.
- [3] Liu M, Cai QX, Liu HZ, et al. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J Appl Microbiol*, 2002, **93**(3): 374-379.
- [4] Lu W, Zhao QM, Chen YL, et al. Distribution of chitinase in *Bacillus thuringiensis* and screening of antifungal

- strains against *Fusarium graminearum*. *Acta Scientiarum Naturalium Univ Nankaiensis: Nat Sci Ed*, 2007, **40**(3): 97–101.
- 卢伟, 赵秋敏, 陈艳玲, 等. 几丁质酶在苏云金芽孢杆菌中的分布及抑小麦赤霉菌菌株的筛选. 南开大学学报: 自然科学版, 2007, **40**(3): 97–101.
- [5] Liu D, Chen Y, Cai J, *et al.* Chitinase B from *Bacillus thuringiensis* and its antagonism and insecticidal enhancing potential. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49**(2): 180–185.
- 刘东, 陈月华, 蔡峻, 等. 苏云金芽孢杆菌 ChiB 特性及其杀虫抑真菌的作用. 微生物学报, 2009, **49**(2): 180–185.
- [6] Ding XZ, Luo ZH, Xia LQ, *et al.* Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant *cryIAc* gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol*, 2008, **56**(5): 442–446.
- [7] Reyes-ramirez A, Escudero-abarca BI, Aguilar-uscanga G, *et al.* Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J Food Sci*, 2004, **69**(5): M131–M134.
- [8] Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME, *et al.* Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(2): 183–192.
- [9] Hu SB, Liu P, Ding XZ, *et al.* Efficient constitutive expression of chitinase in the mother cell of *Bacillus thuringiensis* and its potential to enhance the toxicity of CryIAc protoxin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**(6): 1157–1167.
- [10] Felse PA, Panda T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**(2): 141–151.
- [11] Ni XY, Westpheling J. Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997, **94**(24): 13116–13121.
- [12] Kao PM, Huang SC, Chang YC, *et al.* Development of continuous chitinase production process in a membrane bioreactor by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Process Biochem*, 2007, **42**(4): 606–611.
- [13] Binod P, Sukumaran RK, Shirke SV, *et al.* Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *J Appl Microbiol*, 2007, **103**(5): 1845–1852.
- [14] Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, *et al.* A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **307**(3): 620–625.
- [15] Eleazar Barboza-Corona J, Ortiz-Rodriguez T, de la Fuente-Salcido N, *et al.* Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009, **96**(1): 31–42.
- [16] Chen YL, Lu W, Chen YH, *et al.* Cloning, expression and sequence analysis of *chiA*, *chiB* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* 15A3. *Acta Microbiol Sin*, 2007, **47**(5): 843–848.
- 陈艳玲, 卢伟, 陈月华, 等. 苏云金芽孢杆菌 *chiA*, *chiB* 全基因的克隆、表达及其序列分析. 微生物学报, 2007, **47**(5): 843–848.
- [17] Xiao L, Xie CC, Cai J, *et al.* Identification and characterization of a chitinase-produced *bacillus* showing significant antifungal activity. *Curr Microbiol*, 2009, **58**(5): 528–533.
- [18] Chen CT, Huang CJ, Wang YH, *et al.* Two-step purification of *Bacillus circulans* chitinase A1 expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Protein Expression Purif*, 2004, **37**: 27–31.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1/2): 248–254.
- [20] Fujita, Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73**(2): 245–259.
- [21] van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, *et al.* Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol*, 2008, **8**: 62.
- [22] Delic I, Robbins P, Westpheling J. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, **89**(5): 1885–1889.